

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 8 月 5 日 (05.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/065599 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 16/28, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/68, 1/02, G01N 33/50, 33/53, A61P 25/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000629
- (22) 国際出願日: 2004 年 1 月 23 日 (23.01.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-016790 2003 年 1 月 24 日 (24.01.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 10 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾野 雄一

(ONO, Yuichi) [JP/JP]; 〒5670045 大阪府茨木市紫明園 1-43-604 Osaka (JP). 中川 康子 (NAKAGAWA, Yasuko) [JP/JP]; 〒6060806 京都府京都市左京区下鴨蓼倉町 19-3 Kyoto (JP). 坂本 佳正 (SAKAMOTO, Yoshimasa) [JP/JP]; 〒5690802 大阪府高槻市北園町 2-22 Osaka (JP). 水原 英理 (MIZUHARA, Eri) [JP/JP]; 〒6391054 奈良県大和郡山市新町 305-7 Nara (JP). 中谷 智哉 (NAKATANI, Tomoya) [JP/JP]; 〒6008385 京都府京都市下京区高辻通大宮東入五坊大宮町 90 真徳ハイ ツ 507 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: Lrp4/CORIN DOPAMINE-PRODUCING NEURON PROLIFERATION PRECURSOR CELL MARKER

(54) 発明の名称: Lrp4/Corin ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカー

(57) Abstract: In nerve cell transplantation therapy, it seems preferable from the standpoint of safety to employ cells of a desired cell species alone. Considering the risk for oncogenesis, it also seems preferable to employ nerve cells after the completion of cell division. Considering survival in the host after the transplantation, ability to form proper network, etc., moreover, it seems that the therapeutic effect might be enhanced by using precursor cells at an earlier stage. A gene Lrp4 expressed specifically in dopamine-producing neuron proliferation precursor cells before the completion of cell division is identified. By using the expression of the Lrp4 in cells as an indication, it becomes possible to select cells which are appropriately usable, from the standpoints of safety, survival ratio and the ability to form network, in transplantation therapy for neurodegenerative diseases including Parkinson's disease.

(57) 要約:

神経細胞移植治療においては、安全性の面では目的の細胞種のみからなる細胞群、そして腫瘍形成の危険性を考慮すれば分裂停止後の神経細胞が好ましいと考えられる。さらに、移植先での生存、正しいネットワーク形成能等を考慮するとより早期の前駆細胞により治療効果が増大されると期待される。

本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的に発現する遺伝子 Lrp4 が同定された。細胞における該 Lrp4 の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となる。

WO 2004/065599 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

## 明細書

## Lrp4/Corin ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカー

## 5 技術分野

分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞(progenitor)において発現している遺伝子として Lrp4 を同定した。該遺伝子の発現、または該遺伝子によりコードされる膜貫通蛋白質の発現を検出することにより、パーキンソン病(PD)等の神経変性疾患の移植治療において用いることができるドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することができる。

## 背景技術

ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病(PD)は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である(HARRISON' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 第2巻 第23版, Isselbacher et al. 編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp. 227 5-7)。パーキンソン病の治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うために L-DOPA(3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン)を経口投与する方法が主に採られているが、効果の持続性が良くないことが知られている。

パーキンソン病治療において、最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む6~9週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている(米国特許第5690927号; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 155

- 2 -

- 6-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。
- 10 倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法も提案されている(例えば、特表平 10-508487 号公報;特表平 10-508488 号公報;特表平 10-509034 号公報参照)。この方法においては、拒絶反応を抑制するため、細胞表面上の抗原(MHC クラス I 抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セル
- 15 トーリ細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特表平 11-509170 号公報;特表平 11-501818 号公報;Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9)。MHC がマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も
- 20 解決することができる。

そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES)細胞、骨髄間質細胞などの非神経系細胞からの in vitro におけるドーパミン産生ニューロンの分化系の移植材料としての利用が有望視されている。実際、ラットパーキンソン病モデルの病変線条への ES 細胞移植により機能的なドーパミン産生ニューロンが形成

25 されたとの報告もある(Kim et al (2002) Nature 418: 50-56)。将来的には ES 細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増してくる



ものと思われる。

神経組織の損傷の治療においては脳機能の再構築が必要となり、周囲の細胞と適切なリンクを形成する（ネットワーク形成）ために成熟した細胞ではなくニューロンへと *in vivo* において分化し得る細胞を移植する必要がある。ニューロン

- 5 前駆細胞の移植において上述した供給面以外で問題となるのは、前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。例えば、パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(Lindvall et al. (198
- 10 9) Arch. Neurol. 46: 615-31 ; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特表平 8-509215 号公報 ; 特表平 11-506930 号公報 ; 特表 2002-522070 号公報)、NT2Z 細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特表平 9-5050554 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりト
- 15 ランスフェクトされた細胞、骨髓ストロマ細胞(特表 2002-504503 号公報; 特表 2002-513545 号公報)、遺伝子改変された ES 細胞 (Kim et al (2002) Nature 418: 50-56) 等が挙げられる。しかしながらいずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

- 未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンハイドロキシラーゼ
- 20 (TH) 等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特開 2002-51775 号公報)が提案されている。この方法は、外来
- 25 遺伝子の導入という煩雑な工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面

からも問題である。

### 発明の開示

現時点での PD 移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域あるいは in vitro で分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、いずれも多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましい。また、腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存や、正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得ると期待される。そこで、本発明者は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。そして既に、分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現する遺伝子の一つとして、新規遺伝子 65B13 の単離に成功し、特許出願した（特願 2002-307573 号）。

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5 マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに 2 つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法 (N-RDA; representational difference analysis 法; RDA 法 (Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7) を改良 (「DNA 断片の量の均一化方法及びサブストラクション法」特願 2001-184757 (出願日 2001/6/19) ) により同定した。単離した断片の一つは Lrp4/Corin をコードする cDNA 断片であった。Lrp4 は II 型膜貫通蛋白質をコードしている (図 1)。

in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、Lrp4 は中脳ではドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的に発現すると考えられた (図 4 及び 5)。Lrp4 は胎生期から成人期にかけての心臓に発現しており、血圧調整ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の切断を行うと考えられている II

型膜貫通プロテアーゼである。ANP は前駆型である pro-ANP の状態で発現し、細胞外に分泌された後に Lrp4 より細胞膜表面上で切断され、活性型 ANP となると考えられている。これまで、増殖中のドーパミン産生ニューロン前駆細胞で特異的に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子は報告されていない。細胞膜表面に発現する Lrp4 蛋白質に対する抗体は、Lrp4 発現細胞の分離に非常に効果的であると

5 考えられる。例えば、抗 Lrp4 抗体を用いて、中脳腹側領域または *in vitro* で分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養細胞から、Lrp4 発現細胞を分離することで、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる (図 6)。

10 さらに、該前駆細胞をそのまま、または *in vitro* で増殖させた後に移植することも可能である。本発明の前駆細胞は脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性や *in vivo* でさらに前駆細胞が増殖する可能性もあり、長期的な治療効果が期待できる。また、Lrp4 発現細胞を *in vitro* で分化、成熟させた後に移植を行えば、*in vivo* で何らかの理由でドーパミン産生ニューロンへの分化が行われな

15 い場合にも、治療効果が期待できる。腫瘍化等の危険性を考慮すれば、*in vitro* で増殖させた Lrp4 発現細胞を分化誘導した後に、65B13 等の分裂停止後のニューロンマーカーを用いて分離した細胞を移植すればより高い安全性が期待できる。いずれの方法でも Lrp4 発現細胞を分離して移植治療に用いることで、目的の細胞種のみを分離しているので安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞を用いる

20 ことができるため、生存率やネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。分離直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果を得られない場合があったとしても、本発明のマーカーにより分離される前駆細胞は *in vitro* で培養する等して成熟させることもできるため、最適な分化段階の材料を調製することを可能にする (図 6)。

25 一方、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることは、ドーパミン産生ニューロンに特異的な遺伝子の単離等、パーキンソン病治療のターゲット探索

- 6 -

にも有効である。特に増殖前駆細胞を得られるということは、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の研究や、成熟を指標にしたスクリーニング系だけでなく、前駆細胞を *in vitro* または *in vivo* で増殖させる薬剤のスクリーニングや、*in vivo* で前駆細胞から分化を誘導する薬剤(*in vivo* での再生治療薬剤)のスクリーニング等にも有用である。

より具体的には、本発明は

[1] 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ、

(1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な塩基配列

10 (2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

(3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

15 (4) 配列番号:1 または 2 の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列

(5) 上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した 15 塩基を含む塩基配列

[2] 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体、

(1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列によりコードされるポリペプチド

(2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

20 (3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド

(4) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

25 (5) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を

- 7 -

有するポリペプチド

[3] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、上記[1]記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

5 [4] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、上記[2]記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

[5] 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法、

(1) 上記[3]または[4]記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方  
10 法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程  
(2) 上記(1)において選択された前駆細胞を培養する工程  
(3) 上記(2)において培養された前駆細胞を、分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程

[6] 上記[3]～[5]記載の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニ  
15 ユロン増殖前駆細胞、

[7] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパ  
ミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、上記  
[6]記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を  
用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む  
20 方法、並びに

[8] 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、上記[6]記載の前駆細胞に対  
し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検  
出する工程を含む方法、  
に関する。

25

<マーカーポリヌクレオチドプローブ>

本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブは、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択及び/または検出するマーカーとして使用されるものである。該プローブとして使用されるポリヌクレオチドは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現する Lrp4 ポリペ

5 プチドをコードする配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な塩基配列を含むものである。配列番号:1 はマウス Lrp4 cDNA の塩基配列、そして配列番号:2 はヒト Lrp4 cDNA の塩基配列であり、それぞれ GenBank に登録された配列である (マウス: Accession No. NM\_016869; ヒト: Accession No. XM\_035037)。

ここで、「マーカーポリヌクレオチドプローブ」とは、Lrp4 の発現、特に転

10 写された mRNA を検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指す。二本鎖 cDNA も組織 in situ ハイブリダイゼーションでプローブとして利用可能であることが知られており、本発明のマーカーにはそのような二本鎖 cDNA も含まれる。組織中の RNA の検出において特に好ましいプローブとなるマーカーポリヌクレオチドプ

15 ローブとしては、RNA プローブ(リボプローブ)を挙げることができる。また、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、β-

20 D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシア

25 ミノメチル-2-チオウリジン、β-D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキ

- 9 -

シウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9-β-D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5 オキシ酢酸、ワイブトキソシン、プソイドウリジン、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイブトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含んでもよい。

- 10 さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する Lrp4 ポリペプチドをコードする配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を含む。配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号:1 または 2 に記載された塩基配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1 または 2 記載の配列とは異なる塩基配列を含むものである。本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブはまた、配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において、膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に対して相補的な配列を含むものを包含する。配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列中、シグナル配列は存在せず、マウス Lrp4(配列番号:3)では 113-135 アミノ酸残基、
- 20 ヒト Lrp4(配列番号:4)では 46-68 アミノ酸残基の部分が膜貫通領域を形成している。なお、配列番号:3 及び 4 に記載の配列も各々 GenBank に登録されている。

ここで、或る「塩基配列に対して相補的」とは、塩基配列が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95%以上(例えば、97%または 99%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中の A に対し T(RNA の場合は U)、T または U に対し A、C 対

- 10 -

し G、そして G に対し C が対応して鎖が形成されていることを意味する。そして  
或るポリヌクレオチド同士の塩基配列レベルでの相同性は、BLAST アルゴリズム  
(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7) によって決定することが  
5 できる。このアルゴリズムに基づいた塩基配列についてのプログラムとして、BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10) が開発されており、  
マーカーポリヌクレオチドプローブ配列の相同性の決定に使用することができる。  
具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等を参照  
することができる。

- 10 さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する Lrp4 ポリペプチドをコードする配列番号:1 または 2 の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。Lrp4 については配列番号:1 または 2 で示される塩基配列を有するも  
15 のが公知であるが、そのアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体に相補的な配列を有するものも本発明のマーカーポリペプチドとして利用することができる。このようなアイソフォーム及びアレリック変異体は、配列番号:1 または 2 の塩基配列を含むポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物の cDNA ライブラリー及びゲノムライ  
20 ブラリーから得ることができる。cDNA ライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed.』(Cold Spring Harbor Press  
25 (1989))を参照することができる。また、市販の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーを利用してもよい。



- 1 1 -

より具体的に、cDNA ライブラリーの作製においては、まず、Lrp4 を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294-9)、AGPC 法(Chomczynski and Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-9)等の公知の手法により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を用いて mRNA を精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)のような、直接 mRNA を調製するためのキットを利用してもよい。次に得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)のような cDNA 合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNA は PCR を利用した 5' -RACE 法 (Frohman et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高い cDNA ライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) *Gene* 138: 171-4; Suzuki (1997) *Gene* 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られた cDNA は、適当なベクター中に組み込む。

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して 1 時間以上 68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1%SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、1×SSC、0.1%SDS 中、37℃で 20 分の洗浄を 3 回、最後に、1×SSC、0.1%SDS 中、50℃で 20 分の洗浄を 2 回行うことも考えられる。その他、例えば Expresshyb Hybridization Solution (CLONTECH) 中、55℃で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブ

- 12 -

を添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、Lrp4のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection 9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2<sup>nd</sup> ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection 2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1または2の塩基を含む塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、上述の相同性の決定と同様にBLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。上述の塩基配列についてのプログラムBLASTNの他に、このアルゴリズムに基づいたアミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてBLASTX(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、利用可能である。具体的な解析方法については先に挙げたように、ht

- 13 -

[tp://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).等を参照することができる。

その他、遺伝子増幅技術(PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、Lrp4のアイソフォームやアレリック変異体等、Lrp4と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから、配列番号:1または2に記載の塩基配列を基に設計したプライマーを利用して得ることができる。

ポリヌクレオチドの塩基配列は、慣用の方法により配列決定して確認することができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等による確認が可能である。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

さらに、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブには、上記(1)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な配列、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域部分を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な配列、及び(4)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列の各塩基配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドが含まれる。

このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 mRNAの発現を検出するためのプローブ、増幅して検出を行うためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には15~100、好ましくは15~35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5'末端側には制限酵素認識配列、

- 14 -

タグ等を付加した形態に設計することができる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。

本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、Lrp4 を発現する細胞より上  
5 述のハイブリダイゼーション法、PCR 法等により調製することができる。また、Lrp4 の公知の配列情報に基づいて、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは化学合成により製造することもできる。特に組織中の RNA の検出に好ましいとされるリボプローブは、例えば、プラスミドベクターpSP64 にクローニングした Lrp4 遺伝子またはその一部を逆方向に挿入し、挿入した配列部分をランオフ  
10 転写することにより得ることができる。pSP64 は SP6 プロモーターを含むものであるが、その他、ファージ T3、T7 プロモーター及び RNA ポリメラーゼを組合せてリボプローブを作成する方法も公知である。

#### <抗体>

15 本発明により、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を脳組織、または培養細胞より選択するために利用することができる抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFv) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fv 等の  
20 抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG 等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース

- 15 -

結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造することにより二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変してもよい。

- 5 本発明の抗体は、(1)配列番号:1 または 2 の塩基配列によりコードされるポリペプチド、(2)配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(3)配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド、(4)配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、(5)配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な配列
- 10 に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド、並びに(6)前記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチドのいずれかに対して特異的な抗体である。

- 15 本発明の抗体は、Lrp4 ポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として利用することにより製造することができる。また、Lrp4 ポリペプチドの短い断片はウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合した形で免疫原として用いてもよい。また、Lrp4 のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバ
- 20 ント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

本発明における「Lrp4 ポリペプチド」はペプチド重合体であり、配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げることができる。Lrp4 ポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、

- 25 また修飾されたものであっても良い。さらに、Lrp4 ポリペプチドには膜貫通領域部分を欠く蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質が

- 16 -

含まれる。

本発明において、Lrp4 ポリペプチドは、Lrp4 ポリペプチドの抗原性を有すればよく、配列番号:3 または 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを  
5 包含する。1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U  
SA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982)  
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。そして、このような配列番号:3 または 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有する Lrp4 の抗原性を維持したポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを公知の『Molecular Clon  
ing, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『C  
15 urrent Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) M  
ethod. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6  
等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製し、適宜発現させること  
20 により得ることができる。

Lrp4 ポリペプチド断片は、上記 Lrp4 ポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも 8 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または 15 アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 $\alpha$ ヘリックス及び $\alpha$ ヘリックス形成領域、 $\alpha$ 両親媒性領域、 $\beta$ シート及び $\beta$   
25 シート形成領域、 $\beta$ 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及び

- 17 -

コイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片が Lrp4 のポリペプチド断片に含まれる。本発明における Lrp4 のポリペプチド断片は、Lrp4 ポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であつてもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配

5 列上の疎水性／親水性を解析する方法 (Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法 (Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem 47: 251-76) により推定し、さらにコンピュータープログラム (Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認する PEPSCAN 法 (特表昭 60-500684 号公報) 等により確認することができる。

10 Lrp4 ポリペプチド、及びポリペプチド断片は、Lrp4 を発現する細胞・組織等を原料として、その物理的性質等に基づいて単離することができる。また、公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することもできる。例えば、Lrp4 ポリペプチドを *in vitro* で製造する場合、*in vitro* トランスレーション (Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44) 等の方法  
15 に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、適当な宿主細胞を選択し該ベクターによる形質転換を行い、形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。

20 適当なベクターとして、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターを挙げることができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。ベクターは、導入された宿主細胞内で所望のポリヌクレオチドが発  
25 現されるように制御配列を有し、ポリヌクレオチドは該制御配列下に結合される。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソ-

- 18 -

ム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリ A シグナル、スプライシング及びポリアデニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。ベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドとして、異種蛋白質由来のシグナルペプチドを利用することができる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAG または TGA)の挿入を行ってもよい。

in vitro におけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST (Promega)を例示することができる。また、原核細胞宿主における発現に適した種々のベクターが公知であり（『微生物学基礎講座 8 遺伝子工学』（共立出版）等参照）、原核細胞を宿主として選択した場合、当業者であれば選択した宿主に適したベクター、ベクターの宿主への導入方法を適宜選ぶことができる。その他、酵母等の真菌類、高等植物、昆虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類、種々の培養系細胞(COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637(特開昭 63-299 号公報)等)も Lrp4 ポリペプチド及びその抗原性断片を発現させる宿主として利用することができ、各細胞に適したベクター系、ベクターの宿主細胞への導入手法も公知である。さらに、動物の生体内 (Susumu (1985) Nature 315: 592-4; Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54 等参照)、及び植物体において外来蛋白質を発現させる方法も公知であり Lrp4 ポリヌクレオチドを発現させるために利用することができる。



- 19 -

ベクターへの DNA の挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。また必要に応じ、

5 使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高い塩基配列を選択し、Lrp4 ポリペプチドコード発現ベクターを設計することができる (Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74)。Lrp4 ポリペプチドを産生する宿主は、Lrp4 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものであるが、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

10

宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM (Virology 8: 396 (1959)、MEM (Science 122: 501 (1952))、RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199 (Proc. Soc.

15 Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM 等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清 (FCS) 等の血清を添加し、pH 約 6~8、30~40℃において 15~200 時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

通常、遺伝子組換え技術により製造された Lrp4 ポリペプチドは、まず、ポリ

20 ペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物の回収を行う。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所

25 望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、

- 20 -

ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、例えば、GST との融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。Lrp4 ポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa 等を使用して不要な部分を切断することもできる。

- 5      また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、Lrp4 ポリペプチドに対する抗体を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。さらに、精製したポリペプチドを必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用いて修飾することも可能である。一方、Lrp4
- 15      のポリペプチド断片は、上述の Lrp4 ポリペプチドと同じような合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いて Lrp4 ポリペプチドを切断して製造することもできる。

- ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択するためのポリクローナル抗体
- 20      は、例えば、上述のようにして精製された Lrp4 のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原を Phosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバン
- 25

- 21 -

トを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を 4~21 日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

また、モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milstein の方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT 培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

ハイブリドーマは、その他、最初に EB ウイルスに感染させたヒトリンパ球を in vitro で免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266 等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭 63-17688 号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、

- 22 -

ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

- 5      また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK 参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養すること
- 10    により抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods
- 15    Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

- 抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994)
- 20    J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 63-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7 参照)。

- 多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多
- 25    特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)

- 23 -

異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法 (Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髓腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法 (Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; W093/11161 参照)。

- 10 抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテイン A 及び G を用いて行う他、抗体以外のポリペプチドの製造の場合と同様に上記した蛋白質精製技術によっても行い得る (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテイン A を利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等のプロテイン A カラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) 等により決定することができる。

- 20 抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、ELISA 等により測定することができる。ELISA 法により測定する場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで Lrp4 ポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次
- 25 抗体がアルカリホスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定する

ことができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore (Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

#### <ドーパミン産生ニューロンの選択方法>

- 5 本発明により分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択的に均一な集団として選択する方法が提供された。分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、本発明のマーカージョイントオリゴヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて選択することができる。ここで、「選択」という用語は、或る試料中におけるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の存在を検出すること、及び、存在を
- 10 検出しさらに分離または単離することの両方を含むものである。より具体的には、本発明は、本発明のマーカージョイントオリゴヌクレオチドプローブとドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法を提供するものである。該方法においては、マーカージョイントオリゴヌクレオチドプローブを好ましくは放射性同位体または非
- 15 放射性化合物で標識しておく。例えば、標識するための放射性同位体としては、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 等を挙げることができる。放射標識したマーカージョイントオリゴヌクレオチドプローブを用いた場合、エマルジョンオートラジオグラフィーにより銀粒子を検出することによりマーカと結合するRNAを検出することができる。また、マーカージョイントオリゴヌクレオチドプローブ標識のための非放射性同位体としては、ビオチン、ジ
- 20 ゴキシゲニン等が例示される。ビオチン標識マーカの検出は、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識したアビジンを用いて行うことができる。一方、ジゴキシゲニン標識マーカの検出には、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識した抗ジゴキシゲニン抗体を使用することが
- 25 できる。酵素標識を使用する場合には、酵素の基質と共にインキュベートし、安定な色素をマーカ位置に沈着させることで検出を行う。特に蛍光を利用した、

- 25 -

in situ ハイブリッド形成法(FISH)が簡便であり、特に好ましいものである。

また、本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択するための抗体とドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロンの選択方法が提供される。即ち、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むことが予測される細胞試料と本発明の抗体とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することで Lrp 4 ポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を取得できる(図6参照)。細胞との接触前に、抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに対して添加することにより精製を行うことができる。その他、例えば、磁性粒子を抗体に結合し、該抗体及び抗体に結合した Lrp4 を細胞表面上に発現している細胞を磁石を利用して回収することもできる。また、セルソーター、及び蛍光等により標識した抗 Lrp4 抗体を使用して、フローサイトメトリーにより Lrp4 を発現するドーパミン産生ニューロンを選択することもできる。

さらに、本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を培養し、培養した前駆細胞を分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングすることにより、腫瘍化する危険性の低い移植治療に特に適したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる。分裂停止後のニューロンマーカーとしては、例えば 65B13 を挙げることができる。例えば、65BB13 ポリペプチドに対する抗体を培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と接触させて 65B13 ポリペプチドを発現している細胞を選択することにより分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することができる。また、65B13 は Ig ドメイン接着分子

- 26 -

様の構造を有する。培養細胞中で 65B13 発現させた場合、65B13 を発現させた細胞同士は接着するのに対し、65B13 を発現させていない細胞とは接着しない。そのため、65B13 を介した接着はホモフィリックな結合と考えられている。そこで、65B13 ポリペプチドの細胞外領域部分の接着を利用した 65B13 発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞のスクリーニングも可能である。

Lrp4 発現ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞及び 65B13 発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択及び/またはスクリーニングは、各々 Lrp4 または 65B13 に対するプロモーターを利用して行うこともできる(例えば、特開 2002-51775 号公報参照)。例えば、後述する Lrp4 の発現領域解析により得られるプロモーター部分に対し、GFP 等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、Lrp4 遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。65B13 についても Lrp4 と同様の方法によりスクリーニングが可能である。65B13 については、例えば、特願 2002-307573 号明細書に記載の配列を参照することができる。

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、または in vitro で分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養培地である。in vitro におけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知の ES 細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不老化セルライン(特表平 8-509215 号公報 ; 特表平 11-506930 号公報 ; 特表 2002-522070 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共培養することにより分化させることができる。さらに、線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細



- 27 -

胞を誘導する方法も知られている(特表平 10-509319 号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告もある(特表 2002-530068 号公報)。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、これらを含む如何なる方法により分離または

5 培養された細胞群であってもよい。

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には  
10 特に制限はなく、膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

#### <ドーパミン産生ニューロン前駆細胞>

15 このようにして Lrp4 の発現を指標として獲得された細胞は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞であることから、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面で PD 等の神経変性疾患の移植治療に好ましいものである。Lrp4 の発現を指標として獲得された細胞は、そのまま、または in vitro で  
20 増殖させた後に移植に使用することができる(図 6)。本発明の Lrp4 の発現を指標として選択されるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は増殖中の前駆細胞であることから、脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性、また in vivo においてさらに前駆細胞が増殖する可能性があることから、より長期的な治療効果が期待される。さらに、本方法により得られた本発明の細胞(群)は、分裂停止前の前  
25 駆細胞であることから、in vitro において培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能であり、種々の神経移植治療の材料として

- 28 -

も好ましいものである。例えば、前述したように、Lrp4 の発現を指標として選択された細胞について、さらに細胞分裂停止直後のマーカー(例えば、65B13)を指標とした選択を行うことにより、より移植の上では安全性の高い細胞を得ることもできる。

- 5 本発明の方法により得られたニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$  個、さらに好ましくは  $5 \sim 6 \times 10^4$  個のニューロンを移植する。第 1 の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund 等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall 等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo 等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

- さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD 治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、  
15 並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

#### <遺伝子発現レベルの比較>

- 本発明の抗体を用いて得られた分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治  
20  
25

- 29 -

療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化／誘導／増殖された細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞 in situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNA ドットブロットハイブリダイゼーション、逆転写 PCR、RNase 保護アッセイ、DNA マイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析 (SAGE; serial analysis of gene expression) (Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション (subtractive hybridization)、代表差違分析 (representation difference analysis; RDA) (Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7) 等により行うことができる。

細胞 in situ ハイブリダイゼーションでは、特定の RNA 配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総 RNA または polyA<sup>+</sup>RNA に対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞における RNA のプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNA の大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA 転写産物を in situ で視覚的に捉えることも可能であり (Femino et al. (1998) Science 280: 585-90)、本発明において利用することができる。

遺伝子発現の解析で逆転写 PCR を用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1 つの RNA 転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写 PCR においてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写 PCR を行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じる mRNA アイソフォームを同定することが可能である。例えば、Pykett et al. (19

- 30 -

94) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64 等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明の PCR を利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものである。

- 5 DNA チップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNA チップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたは DNA クローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対する cDNA クローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マ
- 10 イクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン特異的ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞より RNA を調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNA を得る。次に、得られた cDNA 試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識 cDNA 中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現
- 15 されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識 cDNA とチップ上の cDNA クローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を表す蛍光シグナルの強度は、標識 cDNA 内での各配列の発現の度合いを示すこととなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。

- また、縮重 PCR プライマーを用いた逆転写 PCR を行う mRNA ディファレンシャル
- 20 ルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定の mRNA の polyA 尾部に 3' 末端の 1 または 2 つの塩基を変更した修飾オリゴ dT プライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から単離した
- 25 総 RNA に対して逆転写酵素反応を行う (Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA 尾部の直前に C を持つ mR

- 31 -

NA を選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TG を直前に持つ mRNA を増幅することができる。次に、第 2 のプライマーとして、10 塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴ dT プライマー及び第 2 のプライマーを使用して PCR 増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリル  
5 アミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現している mRNA 由来の cDNA は、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法では、同定されていない遺伝子の発現についても解析することができる。

SAGE 分析は、多数の転写産物の発現を同時に検出することができ、また検出  
10 に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞より polyA<sup>+</sup>RNA を慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴ dT プライマーを用い、前記 RNA を cDNA に変換し、4 塩基認識制限酵素(アンカー用酵素;AE)で処理する。これにより、AE 処理断片はその 3' 末端にビオチン基を含  
15 んだ形となる。次に、AE 処理断片をストレプトアビジンに結合させる、結合された cDNA を 2 画分に分け、それぞれの画分を別々の 2 本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リンカー)A 及び B に連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる突出部の配列と相補的な配列を有する 1 本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enzyme;TE)となる IIS 型制限酵素(認識部位より 20bp 以下の離  
20 れた定位置の切断を行う)の 5' 塩基認識配列、及び(3)PCR 用特異的プライマーを構成するのに十分な追加配列より構成される。ここで、リンカーを連結した cDNA をタグ用酵素で切断することにより、リンカー結合型の状態で cDNA 配列部分のみが短鎖配列タグとなる。次に、リンカーの異なる 2 種類のプールを互いに連結し、リンカー A 及び B に特異的プライマーを使用して PCR 増幅する。その結  
25 果、増幅産物はリンカー A 及び B に結合した 2 つの隣接配列タグ(ダイタグ;ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵

- 32 -

素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニングにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定し、配列タグの情報が得られれば、それぞれの

5 タグに該当する mRNA の存在を同定することができる。

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の異なるある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。

10 まず、本発明の前記細胞のうちの試験する細胞の DNA 試料を調製する(以下、テスト DNA と呼ぶ)。次に、比較する細胞の DNA (以下、ドライバー DNA と呼ぶ)を調製する。テスト DNA とドライバー DNA とを逆に用いることもできる。いずれにせよ、テスト DNA に存在し、ドライバー DNA に存在しない遺伝子の存在が検出される。次に、調製したテスト DNA 及び大過剰量のドライバー DNA を混合し、変性さ

15 せ一本鎖 DNA とした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバー DNA 中には存在しない特異的な配列をテスト DNA 由来の DNA のみからなる二本鎖 DNA として単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954 及び Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9 等を参照することができる。

20 RDA 法は、PCR を利用した、ドライバー DNA に存在しないテスト DNA 中の配列を選択的に増幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7 及び Schutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4 を参照することができる。

25 以上のようにして検出、単離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公

- 33 -

知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。

#### <前駆細胞の成熟を指標としたスクリーニング>

本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質  
5 を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。

10 ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、  
15 海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

20

#### <Lrp4 の発現領域解析>

Lrp4 の発現制御領域は、Lrp4 の遺伝子配列を利用してゲノム DNA から公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1 マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊 8 新細胞工学実験プロトコール、東京  
25 大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社(1993) pp. 362-374)が公知であり、利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の 5' 末端の 15~100bp、

- 3 4 -

好ましくは 30～50bp をプローブ DNA として利用して、ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号:1 または 2 の塩基全部またはその 1 部)。このようにして得られるクローンは、10kbp 以上の 5' 非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソ

- 5   ヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、Lrp4 の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

- 10   遺伝子の発現制御領域は、Neural Network 等のプログラム([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html); Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestidge (1995) J. Mol. Biol. 249: 15   923-32)も公知であり、用いることができる。

このようにして単離された、Lrp4 遺伝子の発現領域は、in vivo で分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

## 20   <Lrp4 に対するリガンド>

- 15   Lrp4 ポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。Lrp4 は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で発現されていることから、前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられる。従って、Lrp4
- 25   に対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロンの in vivo、ex vivo 及び in vitro における分化を制



- 35 -

御するのに利用できる可能性がある。Lrp4 ポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、Lrp4 ポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、Lrp4 ポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋めこまれた状態に発現させて用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

10

#### <Lrp4 の発現抑制>

本発明により、Lrp4 が分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で一過性に発現されることが明らかにされたことから、Lrp4 が前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられた。従って、Lrp4 遺伝子の発現を阻害するものは、ドーパミン産生ニューロンの *in vivo*、*ex vivo* 及び *in vitro* における分化を制御するのに利用できる可能性がある。遺伝子の発現を阻害し得るものとして、例えば、アンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNA(small interfering RNA; siRNA)が挙げられる。従って、本発明はこのようなアンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNAを提供するものである。

15

20

25

アンチセンスが標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリ

- 36 -

ッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA 翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生物学実験講座 2 核酸 IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347 (1993))。

本発明の Lrp4 アンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードする DNA は、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸は、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp 以上、さらに好ましくは 500bp 以上であり通常 3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内、より好ましくは 1000bp 以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、Lrp4 ポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

リボザイムとは、RNA を構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に 5' -リン酸と 3' -ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる 5' -スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループ I イントロン RNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経

- 37 -

る二段階反応で行うグループ II イントロン RNA、及び(3)加水分解反応による tRNA 前駆体を 5' 側で切断するリボヌクレアーゼ P の RNA 成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp 程度)であり、RNA を切断して、5' -ヒドロキシル基と 2' -3' 環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くの RNA 配列と相補的となるように設計することにより、標的 RNA 中の塩基配列 UC、UU または UA を認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素 35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

本発明のアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、または naked DNA として ex vivo 法または in vivo 法により遺伝子治療に用いることもできる。

1998 年に、線虫において RNA 同士が邪魔し合い働きを失う現象(RNA 干渉)が観察された(Fire et al. (1998) Nature 391: 806-11)。RNA 干渉とは、二本鎖の人工 RNA を細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有する RNA が分解される現象である。その後の研究により、RNA 干渉等の RNA サイレンシングの現象は、欠陥を持つ mRNA の排除、並びにトランスポゾン、ウイルス等の寄生体に対する

- 38 -

防御のための細胞機構であることが示唆されている。現在では、多くの遺伝子の発現を抑制するためのツールとして、二本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) が利用されており、病気の原因遺伝子等の発現抑制を siRNA を用いて行うことにより病気を治療・予防する方法も検討されている。本発明の siRNA は、

- 5 Lrp4 の mRNA の転写を阻害する限り、特に限定されない。通常、siRNA は、標的 mRNA の配列に対するセンス鎖及びアンチセンス鎖の組合せであり、少なくとも 10 個から標的 mRNA と同じ個数までのヌクレオチド長を有する。好ましくは、15 ～75 個、より好ましくは 18～50 個、さらに好ましくは 20～25 個のヌクレオチド長である。
- 10 Lrp4 発現を抑制するために、siRNA は公知の方法により細胞に導入することができる。例えば、siRNA を構成する二本の RNA 鎖を、一本鎖上にコードする DNA を設計し、該 DNA を発現ベクターに組み込み、細胞を該発現ベクターで形質転換し、siRNA をヘアピン構造を有する二本鎖 RNA として細胞内で発現させることができる。トランスフェクションにより持続的に siRNA を産生するプラスミド発現
- 15 ベクターも設計されている（例えば、RNAi-Ready pSIREN Vector、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech)）。

- siRNA の塩基配列は、例えば、Ambion website ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)) のコンピュータープログラムを用いて設計することができる。機能的 siRNA をスクリーニングするためのキット（例えば、BD Knock
- 20 out RNAi System (BD Biosciences Clontech)）等も市販されており利用可能である。

#### 図面の簡単な説明

- 図 1 は、Lrp4 の構造を模式的に示す図である。TM: 膜貫通ドメイン、FRI: frizzled ドメイン、LDLa: LDL レセプタードメイン、SR: スカベンジャーレセプター
- 25 ドメイン、Pro: セリンプロテアーゼドメイン。

- 39 -

図2は、Lrp4及びShhのmRNAのE12.5マウス後脳腹側及び脊髄における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

図3は、Lrp4、Shh、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、及びNCAMのmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

図4は、Lrp4の中脳における発現パターンを模式的に示す図である。VZ: ventricular zone、ML: mantle layer。

図5は、ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間におけるLrp4、65B13、TH、NCAM及びDATの発現時期を模式的に示す図である。

10 図6は、抗Lrp4抗体を用いたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

図7は、Lrp4のmRNAのE12.5マウス中枢神経系における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。A:矢状面；B:Aの  
15 枠内部分の拡大写真；C:Aの赤線位置での断面。D:Lrp4、Shh及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)のmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現を示す。

図8は、ES細胞からのin vitroドーパミン産生ニューロン分化系におけるLrp4の発現について示す。上は、ES細胞からのドーパミン産生ニューロンの分化を模式的に示す図である。下の写真は、SDIA法によりES細胞よりドーパミン産生ニューロンを分化誘導し、時間を追ってLrp4の発現をRT-PCR法で調べた結果  
20 を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、これらの実施例は本発明をいかなる意味でも限定するものではない。

#### 25 1. ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5

- 40 -

マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに二つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション(N-RDA)法により同定した。単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしている(図1)。

## 5 (1)N-RDA 法

### (1)-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100  $\mu$ M に調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

10 ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (配列番号:5)

ad2A: acggaatgatgt (配列番号:6)

ad3S: gtccatcttctctctgagactctggt (配列番号:7)

ad3A: accagagtctca (配列番号:8)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt (配列番号:9)

15 ad4A: acacactcacag (配列番号:10)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtagacagt (配列番号:11)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:12)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号:13)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:14)

## 20 (1)-2. cDNA 合成

日本 SLC より入手したマウス 12.5 日胚より中脳腹側を切り出し、さらに背腹方向に2つの領域に切り分けた。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全 RNA を調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖 cDNA を合成した。制限酵素 RsaI で消化したのち、ad2 を付加し、ad2S をプライマーとして、15 サイクルの

25 PCR で cDNA を増幅した。増幅条件は 72°C で 5 分インキュベートした後、94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、及び 72°C で 2 分の反応を 15 サイクル行い、最後に 72°C で

- 41 -

2分インキュベートした。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

	10×ExTaq	5 $\mu$ l
	2.5mM dNTP	4 $\mu$ l
	ExTaq	0.25 $\mu$ l
5	100 $\mu$ M primer	0.5 $\mu$ l
	cDNA	2 $\mu$ l
	蒸留水	38.25 $\mu$ l

(1)-3. Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は9  
 10 4℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分  
 の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PC  
 R purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。1回の  
 サブトラクションに3  $\mu$ gずつ使用した。

(1)-4. Testerの作製

15 ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃  
 で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分  
 の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR  
 purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRs  
 aI消化cDNAにad3を付加した。

20 (1)-5. サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した  
 後に、1xPCR buffer 1  $\mu$ lに溶解した。98℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1  
 $\mu$ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

25 ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして10サイクルのPCRで  
 増幅した後(72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及  
 び72℃で2分の反応を10サイクル行った)、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で

- 42 -

消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。さらに 13 サイクルの PCR で増幅した。増幅条件は 94℃で 2 分インキュベートした後、94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、及び 72℃で 2 分の反応を 13 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分インキュベートした。

5 (1)-6. 均一化

サブトラクション 1 回目で増幅した cDNA 8ng に 2xPCR buffer 1  $\mu$ l を加えた。98℃ 5 分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2  $\mu$ l を加えた。さらに 98℃ 5 分の後、68℃で 16 時間ハイブリダイズさせた。

10 ハイブリダイズさせた cDNA を RsaI で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。これを ad3S をプライマーとして 11 サイクルの PCR で増幅した後 (94℃で 2 分インキュベートした後、94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、及び 72℃で 2 分の反応を 11 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分インキュベートした) RsaI で消化し、ad4 を付加した。

(1)-7. サブトラクション 2 回目

15 上記 6 で ad4 を付加した cDNA 20ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad5 を付加した。

(1)-8. サブトラクション 3 回目

20 上記 7 で ad5 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad13 を付加した。

(1)-9. サブトラクション 4 回目

25 上記 8 で ad13 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、以下、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅した cDNA を pCRII (Invitrogen) にクローニングし、ABI3100 シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。



## 2. Lrp4 遺伝子の発現解析

次に、Lrp4 遺伝子を用いて以下のプロトコールにより in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

- 5       まず、マウス 12.5 日胚を OCT で包埋し、厚さ 16  $\mu$ m の新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に 4%PFA で室温 30 分間固定した。PBS で洗浄した後、ハイブリダイゼーション (1  $\mu$ g/mlDIG 化 RNA プローブ、50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS, 50  $\mu$ g/ml yeast RNA, 50  $\mu$ g/ml Heparin) を 65 度で 40 時間行った。その後、洗浄 (50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS) を 65 度で行い、
- 10       RNase 処理 (5  $\mu$ g/ml RNase) を室温 5 分間行った。0.2xSSC で 65 度の洗浄、1xTBS で室温の洗浄ののち、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBS、2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

- in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニュー
- 15       ロンの発生する時期である E12.5 で、Lrp4 は中脳から後脳、脊髄にかけての腹側中心部に特異的発現していることが示された。後脳から脊髄にかけては、Shh と同様の発現パターンを示し、オーガナイザー領域である底板(floor plate) に特異的であることが明らかになった(図 2 及び 7)。中脳では Shh 発現領域の中でもより中心部にのみ発現が見られた(図 3 及び 7)。

- 20       ニューロンの成熟マーカーである NCAM と比較した結果、Lrp4 発現細胞は NCAM 陰性の脳室領域(Ventricular Zone (VZ))内の増殖前駆細胞であった。さらにドーパミンニューロンのマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase;TH)の発現と比較すると、TH は外套層(mantle layer(ML))にのみ発現しているため、同一の細胞で両者の発現が認められることはないものの、背-腹軸
- 25       方向での発現領域は完全に一致していた(図 3 及び 7)。一般に神経管(neural tube)内の神経細胞は、まず VZ 内で増殖し、分化開始とともに分裂を停止し、その

- 44 -

後すぐ外側の ML に移動したのちに成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロンの前駆細胞は、TH 発現領域のすぐ内側の VZ 内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してから TH を発現すると考えられる。即ち、Lrp4 は中脳ではドーパミン産生ニューロンの前駆細胞に特異的に発現すると考えられる

5 (図 4 及び 5)。

### 3. ES 細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロンにおける Lrp4 の発現

次に ES 細胞を in vitro でドーパミン産生ニューロンに分化誘導させた場合に Lrp4 が発現するかどうか検討した。

- 10 まず、SDIA 法 (Kawasaki et. al. (2000) Neuron 28(1): 31-40) により ES 細胞よりドーパミンニューロンへの分化誘導を行った (図 8 上参照)。誘導後 4、6、8、10、12 日後にそれぞれ細胞を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を回収し、RT-PCR を行った。RT-PCR においては、最初に  $1\mu\text{g}$  の total RNA に対して、RNA PCR kit (TaKaRa) を用いて cDNA 合成を行った。このう
- 15 ち 10ng、1ng、0.1ng 相当分の cDNA を鋳型に用いて以下の反応系で PCR を行った。

10×ExTaq	$2\mu\text{l}$
2.5mM dNTP	$1.6\mu\text{l}$
ExTaq	$0.1\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$ プライマー	各 $0.2\mu\text{l}$
20 cDNA	$1\mu\text{l}$
蒸留水	$14.9\mu\text{l}$

94℃で 2 分インキュベートした後、94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、及び 72℃で 2 分の反応を 35 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した。

- 25 Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG / CAGAGTGAACCCAGTGGACATATCTG  
TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTGAGAGTTGG / GAAGCTGGAAAGCCTCCAGGTGTTCC

- 45 -

DAT: CTCCGAGCAGACACCATGACCTTAGC / AGGAGTAGGGCTTGTCTCCCAACCTG

そして、RT-PCR による発現解析の結果、Lrp4 は ES 細胞 (CCE) およびストローマ細胞 (PA6) には発現していないが、分化誘導の結果、TH と同様に 4 日目から発現が誘導されることが明らかになった (図 8)。従って、胎児中脳由来のドーパミンニューロン増殖前駆細胞だけでなく、in vitro で ES 細胞より分化誘導したドーパミンニューロン増殖前駆細胞を分離する際にも Lrp4 はマーカーとして有用である。

#### 10 産業上の利用の可能性

本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する遺伝子 Lrp4 が同定された。細胞における該 Lrp4 の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。また、分裂停止前のニューロン増殖前駆細胞を選択的に得られるため、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、in vitro で最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の遺伝子を用いて得られるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能となった。該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節 (阻害または促進) するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

- 46 -

請求の範囲

1. 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ。
  - 5 (1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な塩基配列
  - (2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
  - (3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
  - 10 (4) 配列番号:1 または 2 の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列
  - (5) 上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した 15 塩基を含む塩基配列
2. 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体。
  - (1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列によりコードされるポリペプチド
  - 15 (2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
  - (3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド
  - (4) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド
  - 20 (5) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド
  - (6) 上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を有するポリペプチド
3. ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項  
25 1 記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

- 47 -

4. ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項 2 記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。
5. 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法。
  - 5 (1) 請求項 3 または 4 記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程
  - (2) 上記 (1) において選択された前駆細胞を培養する工程
  - (3) 上記 (2) において培養された前駆細胞を、分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程
- 10 6. 請求項 3 乃至 5 記載の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞。
7. ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項 6 記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖され
- 15 た細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。
8. 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、請求項 6 記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

図 1

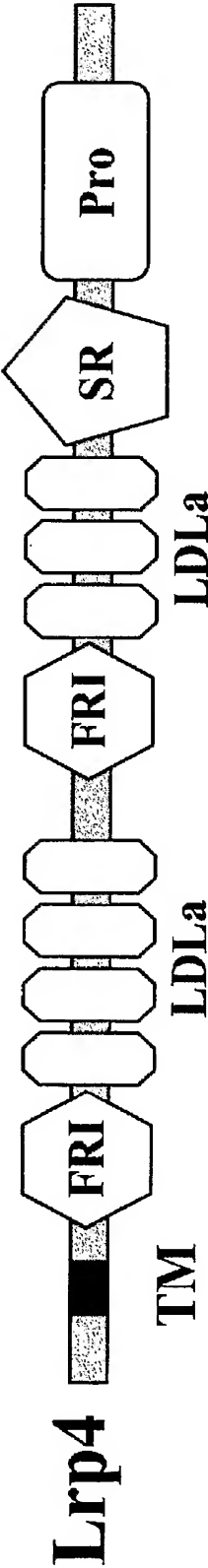
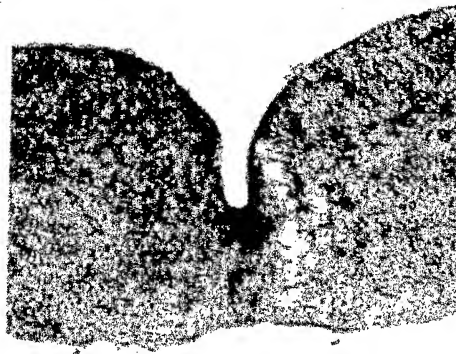


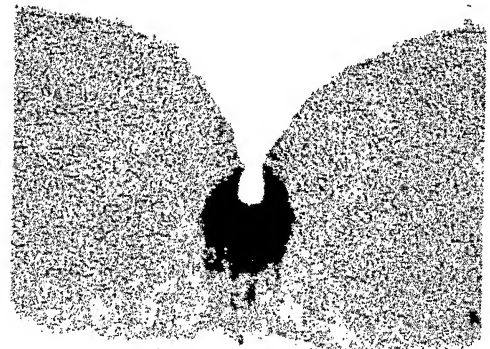
図 2

後脳

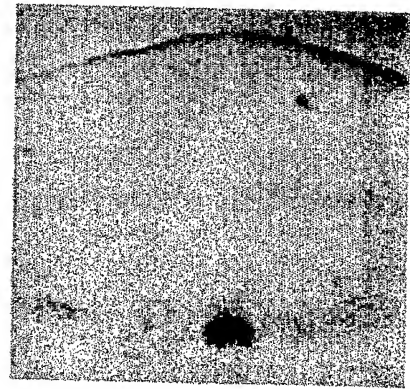
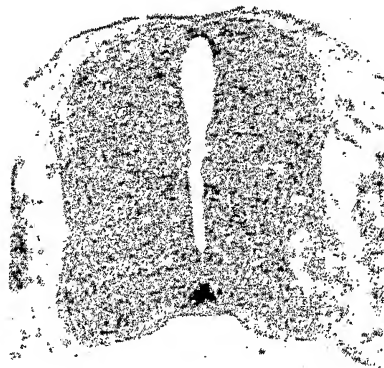
Lrp4



Shh



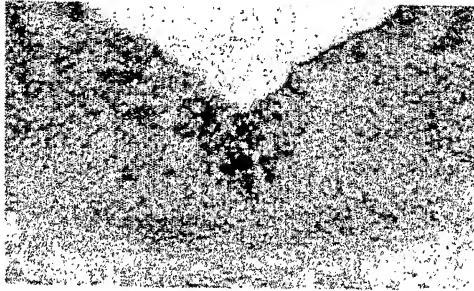
脊髄



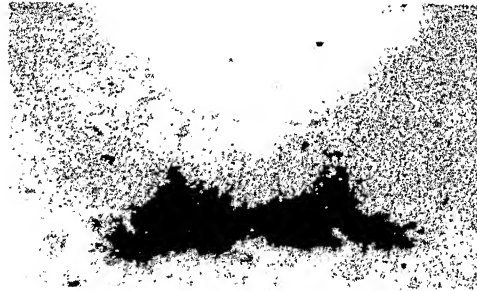
3 / 8

図 3

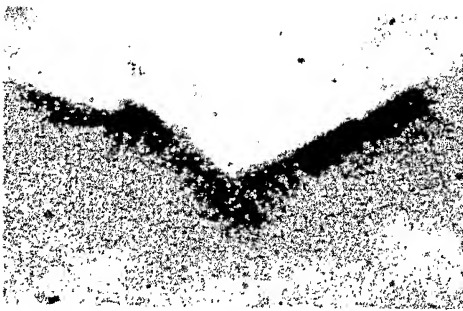
**Lrp4**



**TH**



**Shh**



**NCAM**

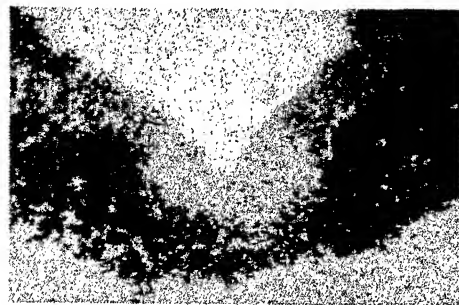




図 4

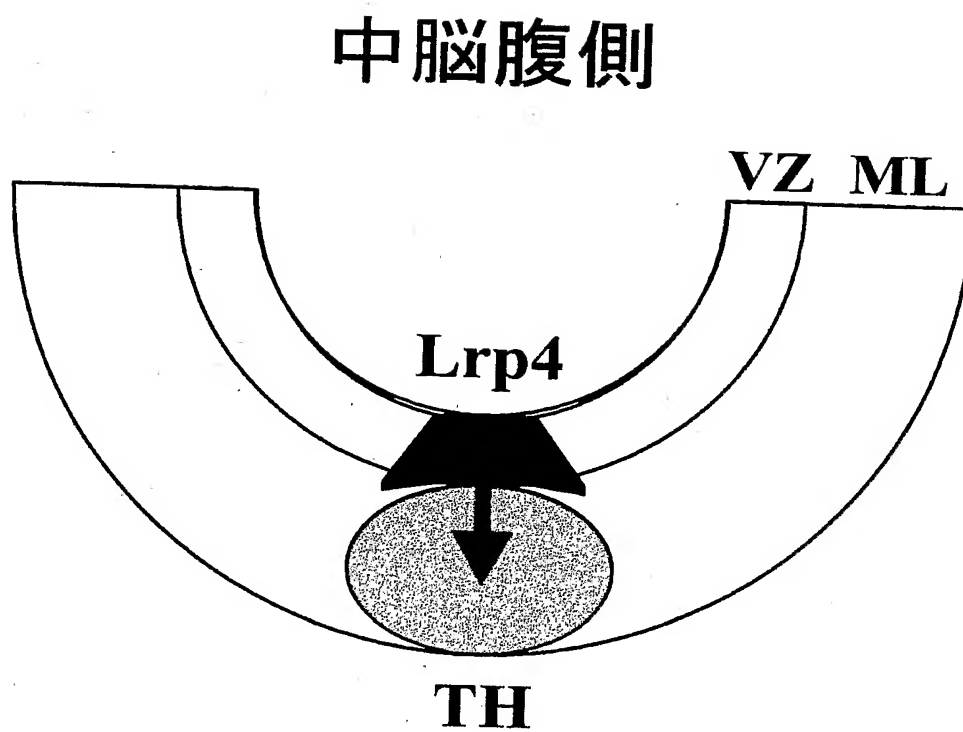


図 5

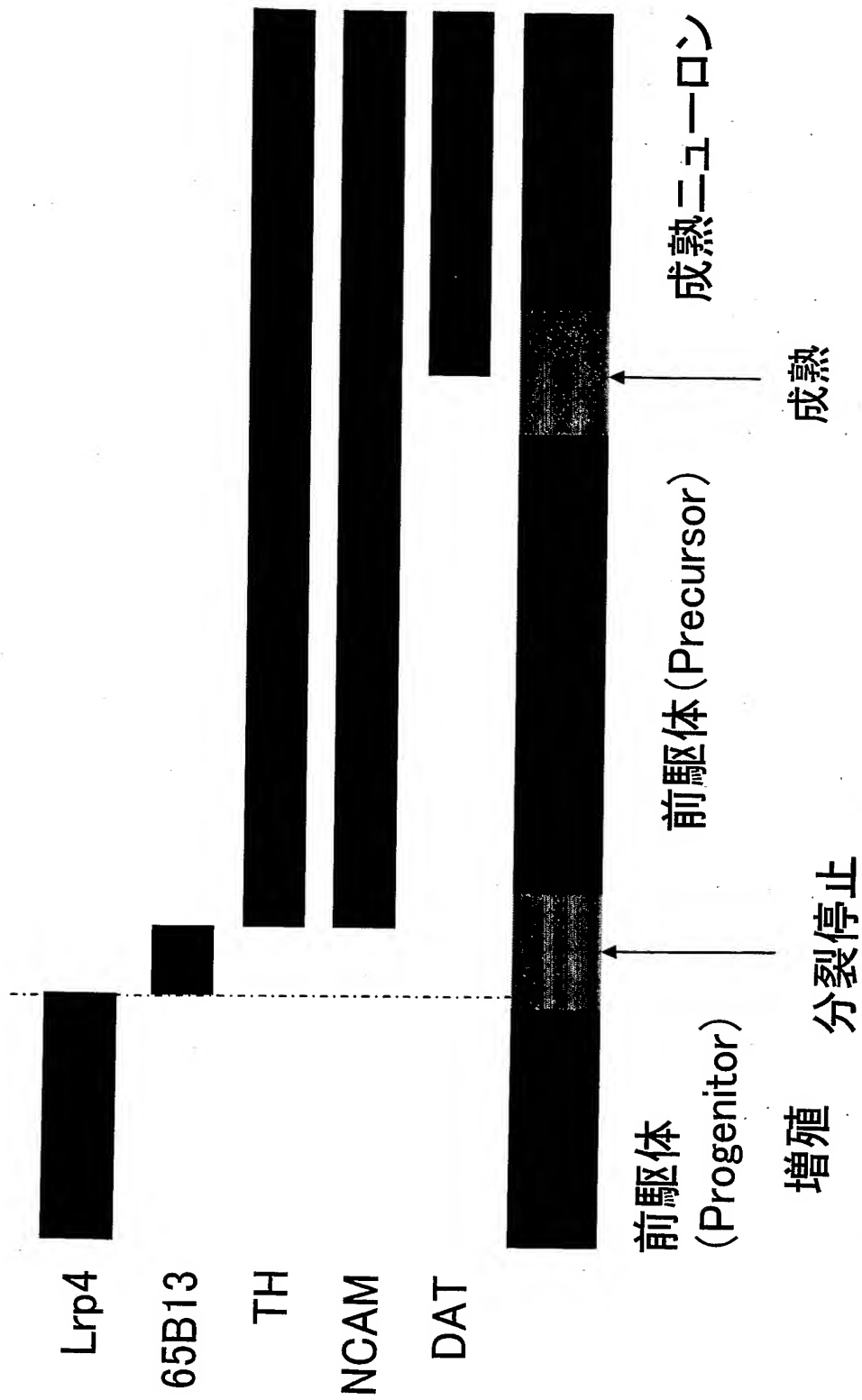
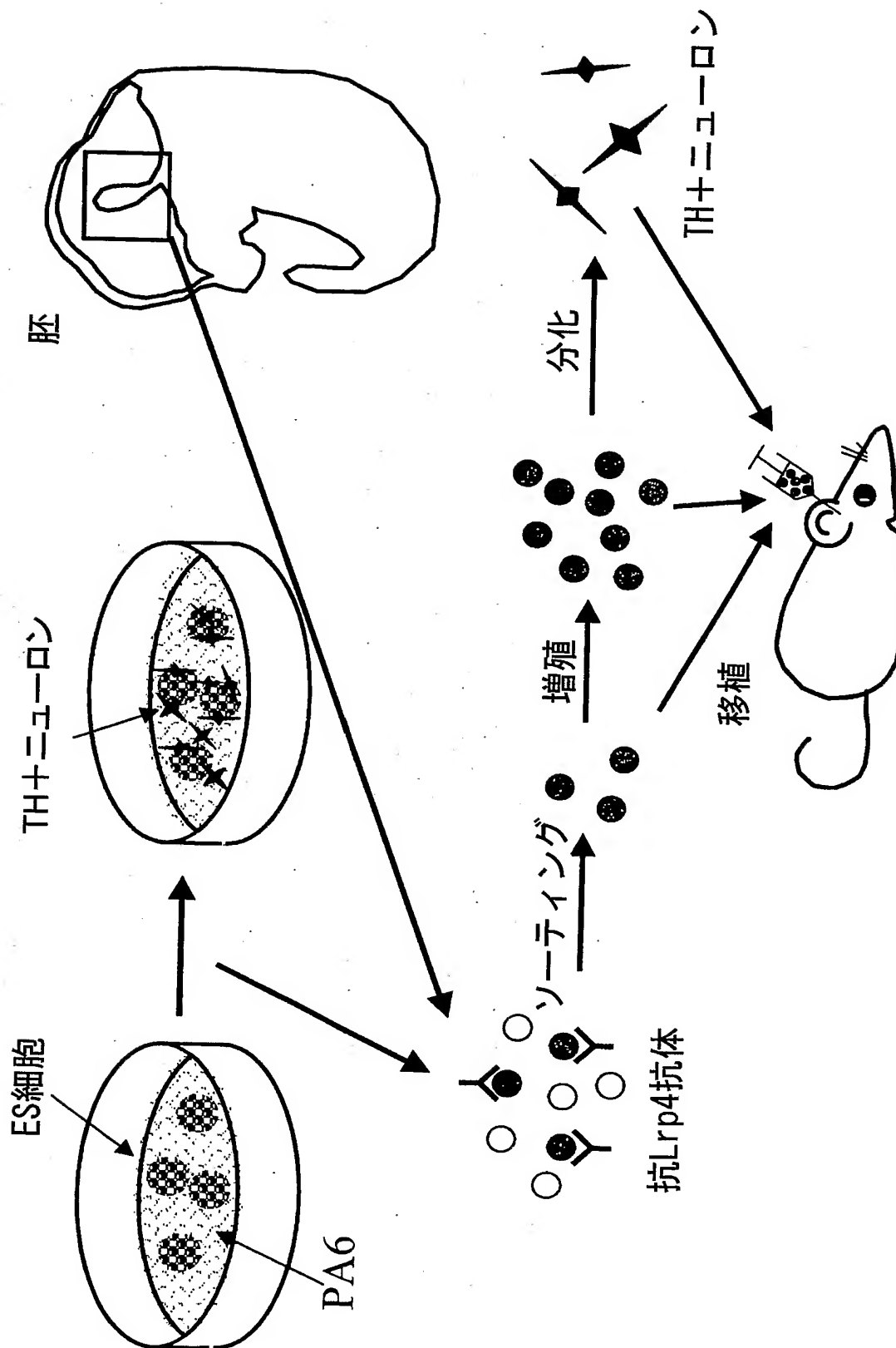


図 6



7 / 8

図 7

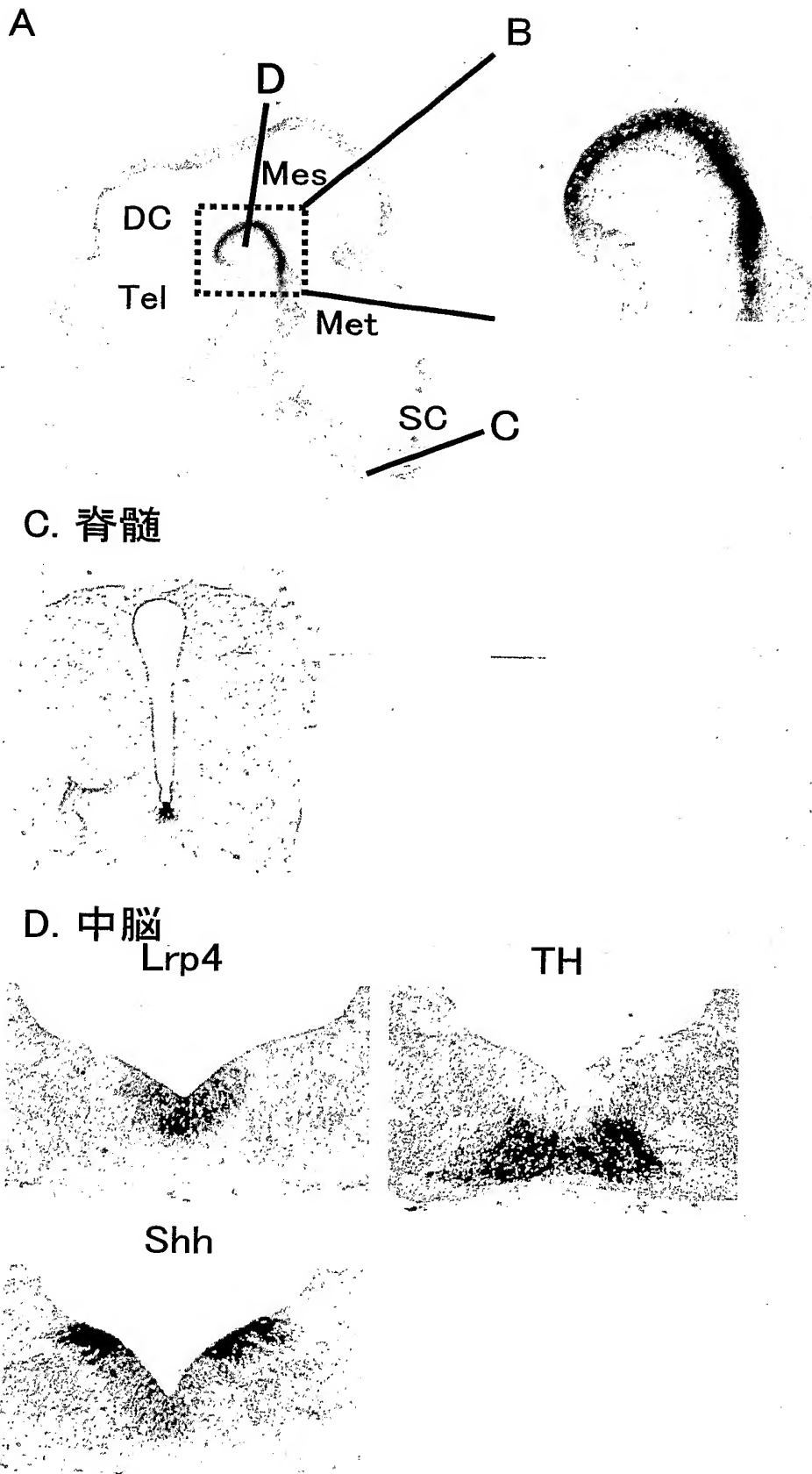
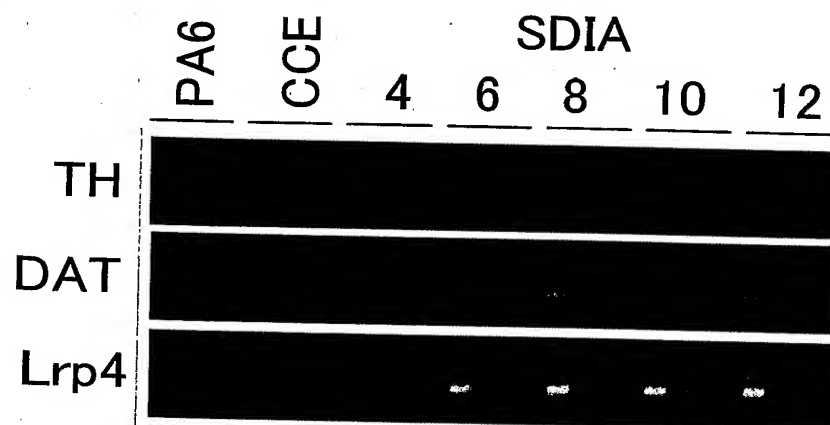
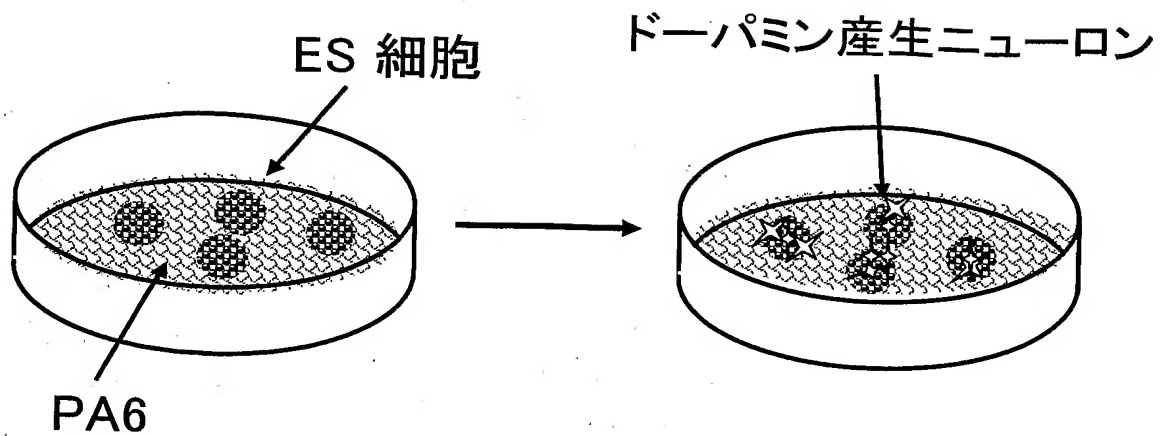


図 8



1 / 3 5

## SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Lrp4/Corin dopaminergic neuronal marker

<130> E1-A0211P

<150> JP 2003-016790

<151> 2003-01-24

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4864

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ctagtcccca ggcagacggt ccctcactcc tgttggttgg cgtcggagac gctggcagtc 60

atgggcaggg tttccttcag cgttcgggtc agctccgtgc ggagagcccg ctgctcttgt 120

cctgggggat gctacctctc ctgcagagtc cctccaacca ccgccctccg tgcactgaac 180

2 / 3 5

ggtcttggct gcgcgggggt tccgggggag actgcaggtg gagccgtcgg acccgcccc 240

ttggggaccc gtggcttcct ctccgggtcc aagttccagg ctcccggcag ctggaaggat 300

tgctttggag ccccgctgc tccagacgtc ttgagagcag acaggagcgt gggcgagggc 360

tgctctcaga agctggtgac tgctaacttg ctgcgttcc tctgctggt gtcctcccc 420

tgcatctgcg cctcatcgt gctgctggcc atctgctgt ctttgtggg aacattaaaa 480

agggtttatt tcaaatcaaa tgacagtga ctttgggtca ctgatgggga agctcgagtg 540

cctggtgtta ttctgtaaa tacagtttat tatgagaaca caggggcgcc ctctctgccc 600

cccagccagt ccaactccagc ctggacaccg agagctcctt ctccagagga ccagagtcac 660

aggaacacaa gcacctgcat gaacatcact cacagccagt gtcaaattct gccctaccac 720

agcacgttgg cacctctctt gccaatgtc aaaaacatgg acatggagaa gttcctcaag 780

ttcttcacgt acctccatcg cctcagttgc tatcaacata tctgctctt cggctgtagc 840

ctcgcttcc ctgagtgcgt tgttgatggc gatgacaggc atggtcttct accctgtaga 900

tctttctgtg aggctgcaaa agaaggatgc gaatctgtcc tgggaatggt gaactcctcc 960

3 / 3 5

tggccggatt ccctcagatg ctctcagttt agggaccaca ctgagactaa cagcagtgtc 1020

agaaagagct gcttctcact gcagcaggaa catggaaagc aatcactctg tggagggggc 1080

gagagcttcc tgtgtaccag cgggctctgc gtccccaaga agctgcagtg taacggctat 1140

aatgactgtg atgactggag cgacgaggcg cattgcaact gcagcaagga tctgtttcac 1200

tgtggcacag gcaagtcct cactacagc ctcttgtgtg atgggtacga tgactgtggg 1260

gacccgagtg acgagcaaaa ctgtgattgt aatctcaca aagagcatcg ctgtggagat 1320

gggcgctgca ttgcggctga gtgggtgtgc gatggggacc atgactgtgt ggacaagtct 1380

gatgagggtca actgctcttg tcacagccag ggcctgggtg aatgcacaag tggacagtgc 1440

atccctagca ccttccagtg tgatggggac gaagactgta aggatgggag tgacgaggag 1500

aactgcagtg acagtcagac gccatgtcca gaaggagaac agggatgctt tggcagttcc 1560

tgcgtcgaat cctgtgctgg tagctctctg tgtgactcag acagcagcct gagtaactgc 1620

agtcaatgtg agcccatcac tttggaactc tgcatgaatt tgctctacaa ccatacacat 1680

tatccaaatt accttgcca cagaactcaa aaggaagcgt ccatcagctg ggagtcatcc 1740



4 / 3 5

cttttccctg cccttgtaca aaccaactgt tacaaatacc tcatgttttt cgcttgcacc 1800

attttggttc caaagtgtga tgtgaataca ggacaacgca tcccgccttg cagactcctg 1860

tgtgagcact ccaaagagcg ctgtgagtct gttctgggaa tcgttggcct gcagtggcct 1920

gaagacaccg actgcaatca atttccagag gaaagttcag acaatcaaac ttgcctcctg 1980

cccaatgaag atgtggaaga atgctctccg agtcacttca aatgccgctc gggacgatgc 2040

gttctgggct ccaggagatg tgacggccag gctgactgtg acgacgacag tgacgaggag 2100

aactgtgggtt gtaaagagag agctctttgg gaatgtccat ttaataagca atgtctgaag 2160

catacattaa tctgcgatgg gtttccagat tgtccagaca gtatggatga aaaaaactgc 2220

tcattttgcc aagacaatga gctggaatgt gccaaccatg agtgtgtgcc gcgtgacctt 2280

tggtgcgacg gatgggtcga ctgctcagac agttctgatg aatggggctg tgtgaccctc 2340

tctaaaaatg ggaactcctc ctcatgtctg actgttcaca aatctgcaaa ggaacaccac 2400

gtgtgtgctg acggctggcg ggagacgttg agtcagctgg cctgcaagca gatgggttta 2460

ggagaaccgt ctgtgaccaa gctgatccca ggacaggaag gccagcagtg gctgaggttg 2520

5 / 3 5

taccccaact gggagaatct caatgggagc accttgcagg agctgctggt atacaggcac 2580

tcctgcccac gcagaagtga gatttccctt ctgtgctcca agcaagactg tggccgccgc 2640

cctgctgccc gaatgaacaa gaggatcctt gggggtcgga ctagtcgtcc tgggaggtgg 2700

ccgtggcagt gctctctgca gagtgaaccc agtggacata tctgtggctg tgcctcatt 2760

gccaagaagt gggtcctgac agttgcccat tgctttgaag ggagagaaga cgctgatgtt 2820

tggaaagtgg tatttggcat aaacaacctg gaccatccat caggcttcat gcagaccgc 2880

tttgtgaaga ccatcctgct acatccccgt tacagtcgag cagtggtaga ctatgatatc 2940

agcgtggtgg agctgagcga tgatatcaat gagacaagct acgtcagacc tgtctgccta 3000

cccagtccgg aggagtatct agaaccagat acgtactgct acatcacagg ctggggccac 3060

atgggcaata aatgccctt taagctgcag gagggagagg tccgcattat ccctctggag 3120

cagtgccagt cctatittga catgaagacc atcaccaatc ggatgatctg tgctggctat 3180

gagtctggca ccgtggactc ctgcatggga gacagcgggt ggctctggt ttgtgaacga 3240

cccgaggagc agtggacatt atttggttta acttcatggg gctccgtctg cttttccaaa 3300

6 / 35

gttctgaggac ctggagtgtg cagcaatgtg tcttactttg tgggctggat tgaaagacaa 3360

atatatatcc agacctttct ccaaaagaaa tcccaaggat aatcagagac tttgtgggga 3420

aacctacatg gagaatgacc ctctgaaaca gaagcttgct ctgccaagag ctgtacgaac 3480

aggcgtttca cggacaggac gctcaacatg caccgcaaga tctctcctgt ttgtgctaga 3540

tgagttttac tcaggcttta atctctttca acattatcat ttattaattt catgaatcct 3600

tttaaaagca cagagcaaag taggttttgt tatttttgcta ggctaacctt gaatgtagtg 3660

tgcaattacc aacccataga gacatttgga gctctagggt aacaagttat agaaagctcc 3720

ttttattact actacaagac acacacggag atacacgctg actgatctcc agtttctgct 3780

taagcccagt ggcttagggg gcacatttca gaactgatct tggagactgg cttttaattt 3840

gtagaaagcc aagagaatat atatgctttt attatttact ctactcttct aaataacttg 3900

aagaaatcat gaaagacaga gaaaggaccc acagtgttga tctagacagt tgaagttgca 3960

agaatgtaaa attctctagc caaccaaact aacactctga agtaagtaga attctatcct 4020

ttctgtattc aaattaagct taaaatctcc accagatttg ttcccgttac tgggaatttt 4080

7 / 3 5

cggagtatgt cacttagatg actgtgatgt caaaagccag gtcaatcctt gaggaaataa 4140

tttgtttgct tatgtgggaa tgaataagaa tctttccatt ccgcaaaaca cacaataa 4200

aaaggagaaa aaaaattaaa taacattcca cacccaatta attctgaaaa ttagtctgct 4260

tgtattcacc caaaacagaa aagttacaga aatatatttc aaagtgcagc aaaatgttgc 4320

atggagtata taacattttg caatttcccc ctcatgatgt ctaacatccg gtattgccat 4380

ttgcctcatt gataattaaa actaaatttt aaggatgctt ttaagcactg ggccacttta 4440

tgggaatcaa ttcccaaagc aattagtggc tacaagtatt ttttcccact aaaaagtttc 4500

aaaacacaaa ccttcatact aaattaatta gccagacatg aactatgtaa catgcaaagc 4560

cctttttgaa caagtaggat gcactgttaa acttcaccag caaccaaact gcctcagtat 4620

tgcttacagg gactacctgc aattttatat gtgtattttg tactcttttt ctagatagtt 4680

caaatgcaaa acattgtttc aaccctatt ctccatgttg ttcacctctt gtcctggaat 4740

ttgttacaaa gtgtgtgtag caaatgattg tactgcggtc aggactatat gaaggtttag 4800

gaccatcggg tcggttttgc tataattgtt ggcacataat taataaaata tttttagcat 4860

8 / 3 5

tggg

4864

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 4933

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

aaatcatccg tagtgctcc ccgggggaca cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa 60

agtggacaga agaataagcg agacttttta tccatgaaac agtctcctgc cctcgctccg 120

gaagagcgct accgcagagc cgggtcccca aagccggtct tgagagctga tgacaataac 180

atgggcaatg gctgctctca gaagctggcg actgctaacc tcctccggtt cctattgctg 240

gtcctgattc catgtatctg tgctctcggt ctcttgctgg tgatcctgct ttcctatggt 300

ggaacattac aaaaggtcta ttttaaatca aatgggagtg aacctttggt cactgatggt 360

gaaatccaag ggtccgatgt tattcttaca aatacaatth ataaccagag cactgtggtg 420

tctactgcac atccccacca acacgttcca gcctggacta cggatgcttc tctcccaggg 480

9 / 35

gaccaaagtc acaggaatac aagtgccctgt atgaacatca cccacagcca gtgtcagatg 540

ctgccctacc acgccacgct gacacctctc ctctcagttg tcagaaacat ggaaatggaa 600

aagttcctca agttttttcac atatctccat cgcctcagtt gctatcaaca tatcatgctg 660

tttggtctga cctcgcctt cctgagtgct atcattgatg gcgatgacag tcatggactc 720

ctgccctgta ggtccttctg tgaggctgca aaagaaggct gtgaatcagt cctggggatg 780

gtgaattact cctggccgga tttcctcaga tgctcccagt ttagaaacca aactgaaagc 840

agcaatgtca gcagaatttg cttctcacct cagcaggaaa acggaaagca attgctctgt 900

ggaaggggtg agaactttct gtgtgccagt ggaatctgca tccccgggaa actgcaatgt 960

aatggctaca acgactgtga cgactggagt gacgaggctc attgcaactg cagcgagaat 1020

ctgttttact gtcacacagg caagtgccctt aattacagcc ttgtgtgtga tggatatgat 1080

gactgtgggg atttgagtga tgagcaaaac tgtgattgca atcccacaac agagcatcgc 1140

tgcgggggacg ggcgtgcat cgccatggag tgggtgtgtg atggtgacca cgactgtgtg 1200

gataagtccg acgaggtcaa ctgctcctgt cacagccagg gtctggtgga atgcagaaat 1260

10 / 35

ggacaatgta tccccagcac gtttcaatgt gatggtgacg aggactgcaa ggatgggagt 1320

gatgaggaga actgcagcgt cattcagact tcatgtcaag aaggagacca aagatgcctc 1380

tacaatccct gccttgattc atgtggtggt agctctctct gtgacccgaa caacagtctg 1440

aataactgta gtcaatgtga accaattaca ttggaactct gcatgaattt gccctacaac 1500

agtacaagtt atccaaatta ttttgccac aggactcaaa aggaagcatc catcagctgg 1560

gagtcttctc ttttccctgc acttggtcaa accaactggt ataaatacct catgttcttt 1620

tcttgaccca ttttggtacc aaaatgtgat gtgaatacag gcgagcgtat ccctccttgc 1680

agggcattgt gtgaacactc taaagaacgc tgtgagtctg ttcttgggat tgtgggccta 1740

cagtggcctg aagacacaga ttgcagtcaa tttccagagg aaaattcaga caatcaaacc 1800

tgcttgatgc ctgatgaata tgtggaagaa tgctcaccta gtcatttcaa gtgccgctca 1860

ggacagtgtg ttctggcttc cagaagatgt gatggccagg ccgactgtga cgatgacagt 1920

gatgaggaaa actgtggttg taaagagaga gatctttggg aatgtccatc caataaaca 1980

tgtttgaagc acacagtgat ctgcgatggg ttcccagact gccctgatta catggacgag 2040

1 1 / 3 5

aaaaactgct cattttgcc aagatgatgag ctggaatgtg caaaccatgc gtgtgtgtca 2100

cgtgacctgt ggtgtgatgg tgaagccgac tgctcagaca gttcagatga atgggactgt 2160

gtgacctct ctataaatgt gaactcctct tcctttctga tggttcacag agctgccaca 2220

gaacaccatg tgtgtgcaga tggctggcag gagatattga gtcagctggc ctgcaagcag 2280

atgggtttag gagaaccatc tgtgaccaa ttgatacagg aacaggagaa agagccgcgg 2340

tggctgacat tacactccaa ctgggagagc ctcaatggga ccactttaca tgaacttcta 2400

gtaaattggc agtcttgtga gagcagaagt aaaatttctc ttctgtgtac taaacaagac 2460

tgtgggcgcc gccctgctgc ccgaatgaac aaaaggatcc ttggaggctg gacgagtcgc 2520

cctggaaggt ggccatggca gtgttctctg cagagtgaac ccagtggaca tatctgtggc 2580

tgtgtcctca ttgccaagaa gtgggttctg acagttgccc actgcttcga ggggagagag 2640

aatgctgcag tttggaaagt ggtgcttggc atcaacaatc tagaccatcc atcagtgttc 2700

atgcagacac gctttgtgaa gaccatcacc ctgcatcccc gctacagtcg agcagtgggtg 2760

gactatgaca tcagcatcgt tgagctgagt gaagacatca gtgagactgg ctacgtccgg 2820



1 2 / 3 5

cctgtctgct tgcccaaccc ggagcagtgg ctagagcctg acacgtactg ctatatcaca 2880

ggctggggcc acatgggcaa taaaatgcc a ttaagctgc aagagggaga ggtccgcatt 2940

atttctctgg aacattgtca gtcctacttt gacatgaaga ccatcaccac tcggatgata 3000

tgtgctggct atgagtctgg cacagttgat tcatgcatgg gtgacagcgg tgggcctctt 3060

gtttgtgaga agcctggagg acggtggaca ttatttggat taacttcatg gggctccgtc 3120

tgctttttcca aagtcctggg gcctggcggt tatagtaatg tgtcatattt cgtcgaatgg 3180

attaaaagac agattttacat ccagaccttt ctctaaact aattataagg atgatcagag 3240

acttttgcca gctacactaa aagaaaatgg ctttcttgac tgtgaagagc tgccctgcaga 3300

gagctgtaca gaagcacttt tcatggacag aaatgctcaa tcgtgcactg caaatttgca 3360

tgtttgtttt ggactaattt ttttcaattt attttttcac cttcattttt ctcttatttc 3420

aagttcaatg aaagacttta caaaagcaaa caaagcagac tttgtccttt tgccaggcct 3480

aaccatgact gcagcacaaa attatcgact ctggcgagat ttaaaatcag gtgctacagt 3540

aacaggttat ggaatggtct cttttatcct atcacaaaaa aagacataga tatttaggct 3600

1 3 / 3 5

gattaattat ctctaccagt ttttgtttct caagctcagt gcatagtggg aaatttcagt 3660

gttaacattg gagacttgct tttctttttc tttttttata cccacaatt cttttttatt 3720

acatttcgaa ttttagggta cagcagcaca acgtgcaggt tagttacata tgtatacatg 3780

tgccatgttg gtgtgctgaa cccagtaact cgtcatttga tttattaaaa gccaaagataa 3840

tttcatgtt taaagtattt actattacc ccttctaagt ttgcataat tctgagaact 3900

gataaaagac agcaataaaa gaccagtgtc atccatttag gtagcaagac atattgaatg 3960

caaagttctt tagatatcaa tattaacact tgacattatt ggacccccca ttctggatgt 4020

atatcaagat cataatttta tagaagagtc tctatagaac tgcctcata gctgggttg 4080

ttcaggatat atgagttggc tgattgagac tgcaacaact acatctatat ttatgggcaa 4140

tattttgttt tacttatgtg gcaaagaact ggatattaaa ctttgcaaaa gagaatttag 4200

atgagagatg caatttttta aaaagaaaat taatttgcac ccctcgttta attaaattta 4260

tttttcagtt ttcttgctt catccatacc aacaaagtca taaagagcat attttagagc 4320

acagtaagac ttgcatgga gtaaaacatt ttgtaatttt cctcaaaaga tgtttaatat 4380

1 4 / 3 5

ctggttttctt ctcatgtgta attaaaattt tagaaatgat ttttagctct aggccacttt 4440

acgcaactca atttctgaag caattagtgg taaaaagtat tttcccccac taaaaaactt 4500

taaaacacaa atcttcatat atacttaatt taattagtca ggcattccatt ttgcctttta 4560

aacaactagg attccctact aacctccacc agcaacctgg actgcctcag cattccaaat 4620

agatactacc tgcaatttta tacatgtatt tttgtatctt ttctgtgtgt aaacatagtt 4680

gaaattcaaa aagttgtagc aatttctata ctattcatct cctgtccttc agtttgtata 4740

aacctaagga gagtgtgaaa tccagcaact gaattgtggt cacgattgta tgaaagttca 4800

agaacatatg tcagttttgt tacagttgta gctacatact caatgtatca acttttagcc 4860

tgctcaactt aggctcagtg aaatatatat attatactta ttttaaataa ttcttaatac 4920

aaataaaatg gta 4933

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

1 5 / 3 5

&lt;400&gt; 3

Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala

1 5 10 15

Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro

20 25 30

Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro

35 40 45

Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg

50 55 60

Gly Phe Leu Ser Gly Ser Lys Phe Gln Ala Pro Gly Ser Trp Lys Asp

65 70 75 80

Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser

85 90 95

Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg

100 105 110

Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu

115 120 125

Leu Ala Ile Leu Leu Ser Phe Val Gly Thr Leu Lys Arg Val Tyr Phe

1 6 / 3 5

130	135	140
Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ala Arg Val		
145	150	155
160		
Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala		
165	170	175
Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala		
180	185	190
Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn		
195	200	205
Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala		
210	215	220
Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys		
225	230	235
240		
Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu		
245	250	255
Phe Gly Cys Ser Leu Ala Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp		
260	265	270

1 7 / 3 5

Arg His Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu

275

280

285

Gly Cys Glu Ser Val Leu Gly Met Val Asn Ser Ser Trp Pro Asp Ser

290

295

300

Leu Arg Cys Ser Gln Phe Arg Asp His Thr Glu Thr Asn Ser Ser Val

305

310

315

320

Arg Lys Ser Cys Phe Ser Leu Gln Gln Glu His Gly Lys Gln Ser Leu

325

330

335

Cys Gly Gly Gly Glu Ser Phe Leu Cys Thr Ser Gly Leu Cys Val Pro

340

345

350

Lys Lys Leu Gln Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp

355

360

365

Glu Ala His Cys Asn Cys Ser Lys Asp Leu Phe His Cys Gly Thr Gly

370

375

380

Lys Cys Leu His Tyr Ser Leu Leu Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly

385

390

395

400

Asp Pro Ser Asp Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Leu Thr Lys Glu His

405

410

415

1 8 / 3 5

Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys Ile Ala Ala Glu Trp Val Cys Asp Gly

420

425

430

Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His

435

440

445

Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Thr Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr

450

455

460

Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu

465

470

475

480

Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys

485

490

495

Phe Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp

500

505

510

Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu

515

520

525

Glu Leu Cys Met Asn Leu Leu Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr

530

535

540

Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser

1 9 / 3 5

545 550 555 560

Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe

565 570 575

Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln

580 585 590

Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys

595 600 605

Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp

610 615 620

Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu

625 630 635 640

Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg

645 650 655

Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp

660 665 670

Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala

675 680 685



20 / 35

Leu Trp Glu Cys Pro Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile

690

695

700

Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys

705

710

715

720

Ser Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val

725

730

735

Pro Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser

740

745

750

Asp Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser

755

760

765

Leu Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp

770

775

780

Gly Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu

785

790

795

800

Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln

805

810

815

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu

820

825

830

2 1 / 3 5

Gln Glu Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile

835

840

845

Ser Leu Leu Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg

850

855

860

Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp

865

870

875

880

Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly

885

890

895

Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe

900

905

910

Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn

915

920

925

Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr

930

935

940

Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile

945

950

955

960

Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg

2 2 / 3 5

965

970

975

Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr

980

985

990

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys

995

1000

1005

Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln

1010

1015

1020

Ser Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala

1025

1030

1035

Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly

1040

1045

1050

Gly Pro Leu Val Cys Glu Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe

1055

1060

1065

Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly

1070

1075

1080

Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu

1085

1090

1095

2 3 / 3 5

Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly

1100

1105

1110

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1042

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Lys Gln Ser Pro Ala Leu Ala Pro Glu Glu Arg Tyr Arg Arg Ala

1

5

10

15

Gly Ser Pro Lys Pro Val Leu Arg Ala Asp Asp Asn Asn Met Gly Asn

20

25

30

Gly Cys Ser Gln Lys Leu Ala Thr Ala Asn Leu Leu Arg Phe Leu Leu

35

40

45

Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Val Leu Leu Val Ile

50

55

60

Leu Leu Ser Tyr Val Gly Thr Leu Gln Lys Val Tyr Phe Lys Ser Asn

65

70

75

80

Gly Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ile Gln Gly Ser Asp Val

2 4 / 3 5

85

90

95

Ile Leu Thr Asn Thr Ile Tyr Asn Gln Ser Thr Val Val Ser Thr Ala

100

105

110

His Pro Asp Gln His Val Pro Ala Trp Thr Thr Asp Ala Ser Leu Pro

115

120

125

Gly Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Ala Cys Met Asn Ile Thr His

130

135

140

Ser Gln Cys Gln Met Leu Pro Tyr His Ala Thr Leu Thr Pro Leu Leu

145

150

155

160

Ser Val Val Arg Asn Met Glu Met Glu Lys Phe Leu Lys Phe Phe Thr

165

170

175

Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Met Leu Phe Gly Cys

180

185

190

Thr Leu Ala Phe Pro Glu Cys Ile Ile Asp Gly Asp Asp Ser His Gly

195

200

205

Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu Gly Cys Glu

210

215

220

2 5 / 3 5

Ser Val Leu Gly Met Val Asn Tyr Ser Trp Pro Asp Phe Leu Arg Cys

225 230 235 240

Ser Gln Phe Arg Asn Gln Thr Glu Ser Ser Asn Val Ser Arg Ile Cys

245 250 255

Phe Ser Pro Gln Gln Glu Asn Gly Lys Gln Leu Leu Cys Gly Arg Gly

260 265 270

Glu Asn Phe Leu Cys Ala Ser Gly Ile Cys Ile Pro Gly Lys Leu Gln

275 280 285

Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp Glu Ala His Cys

290 295 300

Asn Cys Ser Glu Asn Leu Phe His Cys His Thr Gly Lys Cys Leu Asn

305 310 315 320

Tyr Ser Leu Val Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly Asp Leu Ser Asp

325 330 335

Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Pro Thr Thr Glu His Arg Cys Gly Asp

340 345 350

Gly Arg Cys Ile Ala Met Glu Trp Val Cys Asp Gly Asp His Asp Cys

355 360 365

26 / 35

Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His Ser Gln Gly Leu

370

375

380

Val Glu Cys Arg Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr Phe Gln Cys Asp

385

390

395

400

Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ser Val

405

410

415

Ile Gln Thr Ser Cys Gln Glu Gly Asp Gln Arg Cys Leu Tyr Asn Pro

420

425

430

Cys Leu Asp Ser Cys Gly Gly Ser Ser Leu Cys Asp Pro Asn Asn Ser

435

440

445

Leu Asn Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu Glu Leu Cys Met

450

455

460

Asn Leu Pro Tyr Asn Ser Thr Ser Tyr Pro Asn Tyr Phe Gly His Arg

465

470

475

480

Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Ala

485

490

495

Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe Phe Ser Cys Thr

2 7 / 3 5

500

505

510

Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Glu Arg Ile Pro Pro

515

520

525

Cys Arg Ala Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys Glu Ser Val Leu

530

535

540

Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp Cys Ser Gln Phe

545

550

555

560

Pro Glu Glu Asn Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Met Pro Asp Glu Tyr

565

570

575

Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg Ser Gly Gln Cys

580

585

590

Val Leu Ala Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp Cys Asp Asp Asp

595

600

605

Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Asp Leu Trp Glu Cys

610

615

620

Pro Ser Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Val Ile Cys Asp Gly Phe

625

630

635

640



28 / 35

Pro Asp Cys Pro Asp Tyr Met Asp Glu Lys Asn Cys Ser Phe Cys Gln

645

650

655

Asp Asp Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Ala Cys Val Ser Arg Asp Leu

660

665

670

Trp Cys Asp Gly Glu Ala Asp Cys Ser Asp Ser Ser Asp Glu Trp Asp

675

680

685

Cys Val Thr Leu Ser Ile Asn Val Asn Ser Ser Ser Phe Leu Met Val

690

695

700

His Arg Ala Ala Thr Glu His His Val Cys Ala Asp Gly Trp Gln Glu

705

710

715

720

Ile Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu Gly Glu Pro Ser

725

730

735

Val Thr Lys Leu Ile Gln Glu Gln Glu Lys Glu Pro Arg Trp Leu Thr

740

745

750

Leu His Ser Asn Trp Glu Ser Leu Asn Gly Thr Thr Leu His Glu Leu

755

760

765

Leu Val Asn Gly Gln Ser Cys Glu Ser Arg Ser Lys Ile Ser Leu Leu

770

775

780

29 / 35

Cys Thr Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg Met Asn Lys  
785 790 795 800

Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp Pro Trp Gln  
805 810 815

Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly Cys Val Leu  
820 825 830

Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe Glu Gly Arg  
835 840 845

Glu Asn Ala Ala Val Trp Lys Val Val Leu Gly Ile Asn Asn Leu Asp  
850 855 860

His Pro Ser Val Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr Ile Ile Leu  
865 870 875 880

His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile Ser Ile Val  
885 890 895

Glu Leu Ser Glu Asp Ile Ser Glu Thr Gly Tyr Val Arg Pro Val Cys  
900 905 910

Leu Pro Asn Pro Glu Gln Trp Leu Glu Pro Asp Thr Tyr Cys Tyr Ile

30 / 35

915

920

925

Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys Leu Gln Glu

930

935

940

Gly Glu Val Arg Ile Ile Ser Leu Glu His Cys Gln Ser Tyr Phe Asp

945

950

955

960

Met Lys Thr Ile Thr Thr Arg Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu Ser Gly

965

970

975

Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu

980

985

990

Lys Pro Gly Gly Arg Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser

995

1000

1005

Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser

1010

1015

1020

Tyr Phe Val Glu Trp Ile Lys Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu

1025

1030

1035

1040

Leu Asn

3 1 / 3 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 5

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 6

acggaatgat gt

12

3 2 / 3 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 7

gtccatcttc tctctgagac tctggt

26

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 8

accagagtct ca

12

3 3 / 3 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 9

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 10

acacactcac ag

12

3 4 / 3 5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 11

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 12

actgtcacac tg

12

3 5 / 3 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 13

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for  
cDNA amplification

&lt;400&gt; 14

acgatcgaca gt

12



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000629

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/28, C12N5/08, C12P21/08, C12Q1/68,  
C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/53, A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/28, C12N5/08, C12P21/08, C12Q1/68,  
C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/53, A61P25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 99/64608 A1 (Schering AG.), 16 December, 1999 (16.12.99), & EP 1084259 A1 & JP 2002-517253 A	2 1, 3-8
X A	WO 01/057194 A2 (Corvas Int Inc.), 09 August, 2001 (09.08.01), & EP 1252300 A2 & US 2003/0119168 A1 & JP 2003-521920 A	2 1, 3-8
X A	Hooper, J.D. et al., Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes., Eur.J.Biochem., Vol.267, No.23, pages 6931 to 6937 (2000)	2 1, 3-8
X A	WO 00/06700 A1 (Layton Bioscience Inc.), 10 February, 2000 (10.02.00), & EP 1109887 A1	6-8 1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 February, 2004 (20.02.04)

Date of mailing of the international search report  
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000629

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 6277820 B1 (Genentech Inc.), 21 August, 2001 (21.08.01), (Family: none)	6 1-5
A	Yan, W. et al., Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart., J.Biol.Chem., Vol.274, No.21, pages 14926 to 14935, (1999)	1-8
A	Tomita, Y. et al., A novel low-density lipoprotein receptor-related protein with type II membrane protein-like structure is abundant in heart., J. Biochem., Vol.124, No.4, pages 784 to 789, (1998)	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000629

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09、C07K16/28、C12N5/08、C12P21/08、C12Q1/68、C12Q1/02、G01N33/50、G01N33/53、A61P25/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09、C07K16/28、C12N5/08、C12P21/08、C12Q1/68、C12Q1/02、G01N33/50、G01N33/53、A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq、GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq、  
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 99/64608 A1 (Schering AG) 1999.12.16 & EP 1084259 A1 & JP 2002-517253 A	2 1, 3-8
X A	WO 01/057194 A2 (Corvas Int Inc) 2001.08.09 & EP 1252300 A2 & US 2003/0119168 & JP 2003-521920 A	2 1, 3-8
X A	Hooper, J. D. et al., Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. Eur. J. Biochem., Vol. 267, No. 23, pp. 6931-6937 (2000)	2 1, 3-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.02.2004

国際調査報告の発送日

09.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村明照

4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：